



d'invention

Certificat d'utilité

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 21 JAN. 2010

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'M. Planche', is written over a horizontal line.

Martine PLANCHE

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

Réservé à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES **25.06.98**
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL
DÉPARTEMENT DE DÉPÔT **75** **98 08093-**
DATE DE DÉPÔT **25 JUIN 1998**

1 **NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE**
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

BREESE-MAJEROWICZ
3, avenue de l'Opéra
75001 PARIS

2 **DEMANDE** Nature du titre de propriété industrielle

☒ brevet d'invention

☐ demande divisionnaire

☐ certificat d'utilité

☐ transformation d'une demande
de brevet européen

☒ demande initiale

☐ brevet d'invention

☐ certificat d'utilité n°

date

n° du pouvoir permanent références du correspondant

L38B1822FR

téléphone

01.47.03.67.77.

Établissement du rapport de recherche

☐ différé

☒ immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance

☐ oui

☐ non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

**UTILISATION DE RECEPTEURS DE LA FAMILLE REV-ERB POUR LE CRIBLAGE DE
SUBSTANCES UTILES DANS LE TRAITEMENT DES DYSFONCTIONNEMENTS DU
METABOLISME LIPIDIQUE.**

3 **DEMANDEUR (S)**

n° SIREN

code APE-NAF

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

Lipha

Forme juridique

S.A.

Nationalité (s) **FRANCAISE**

Adresse (s) complète (s)

Pays

37, rue Saint-Romain
69379 LYON Cedex 08

FRANCE

4 **INVENTEUR (S)** Les inventeurs sont les demandeurs

☐ oui

☒ non

En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre ☐

Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 **RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES**

☐ requise pour la 1ère fois

☐ requise antérieurement au dépôt ; joindre copie de la décision d'admission

6 **DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE**

pays d'origine

numéro

date de dépôt

nature de la demande

7 **DIVISIONS**

antérieures à la présente demande n°

date

n°

date

8 **SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE**

(nom et qualité du signataire)

Marc MAJEROWICZ
96703

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI



BREVET D'INVENTION, CERTIFICAT D'UTILITE

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

DIVISION ADMINISTRATIVE DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Petersbourg
75800 Paris Cédex 08

Tél. : 01 53 04 53 04 - Télécopie : 01 42 93 59 30 L38B1822FR

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

98 08 098

TITRE DE L'INVENTION :

UTILISATION DE RECEPTEURS DE LA FAMILLE REV-ERB POUR LE CRIBLAGE
DE SUBSTANCES UTILES DANS LE TRAITEMENT DES DYSFONCTIONNEMENTS
DU METABOLISME LIPIDIQUE.

LE(S) SOUSSIGNÉ(S)

BREESE-MAJEROWICZ
3, avenue de l'Opéra
75001 PARIS

DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

RASPE Eric
C/O
Lipha (S.A.)
37, rue Saint-Romain
69379 LYON Cedex 08

BONHOMME Yves
C/O
Lipha (S.A.)
37, rue Saint-Romain
69379 LYON Cedex 08

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

Le 25 Juin 1998

Marc MAJEROWICZ
96703

UTILISATION DE RÉCEPTEURS DE LA FAMILLE REV-
ERB POUR LE CRIBLAGE DE SUBSTANCES UTILES DANS LE
TRAITEMENT DES DYSFONCTIONNEMENTS DU MÉTABOLISME
LIPIDIQUE.

5

La présente invention est relative à
l'utilisation de récepteurs de la famille Rev-erb pour
le criblage de substances utiles dans le traitement des
dysfonctionnements du métabolisme lipidique, liés
notamment à l'apolipoprotéine C-III. L'invention
concerne plus particulièrement les méthodes de criblage
permettant de sélectionner des substances utiles pour le
traitement de ces dysfonctionnements. L'invention
concerne enfin l'utilisation des substances ainsi
identifiées pour la préparation de compositions
thérapeutiques utiles pour le traitement des
dysfonctionnements du métabolisme lipidique liés à
l'apolipoprotéine C-III, comme par exemple
l'athérosclérose.

L'apolipoprotéine C-III, ci-après nommée apo
C-III, est une glycoprotéine de 79 acides aminés
synthétisée dans le foie et dans une moindre mesure dans
l'intestin. Elle joue un rôle majeur dans le métabolisme
des triglycérides plasmatiques. En effet, les
concentrations plasmatiques d'apo C-III sont corrélées
positivement aux taux plasmatiques de triglycérides, que
ce soit dans la population normale ou chez des patients
hypertriglycéridémiques (1-4). De plus, la distribution
relative de l'apo C-III par rapport aux autres classes
de lipoprotéines semble importante : une augmentation de
la concentration d'apo C-III dans les particules qui
contiennent de l'Apo B (apo C-III-LpB) est associée à
une élévation du risque de maladies cardiaques ou

coronariennes (5). Plusieurs évidences lient l'apo C-III au catabolisme des triglycérides plasmatiques.

Une carence en apo C-III se traduit par une augmentation du catabolisme des particules de très faible densité (VLDL), alors qu'une augmentation de la synthèse de l'apo C-III apparaît chez les patients hypertriglycéridémiques (6,7).

De plus, des études génétiques ont mis en évidence la relation existant entre certains polymorphismes du gène de l'apo C-III et des concentrations élevées de triglycérides et d'apo C-III plasmatiques (8,9).

Enfin, la surexpression de l'apo C-III humaine dans des animaux transgéniques s'est traduite par le développement d'une hypertriglycéridémie alors que la délétion du gène endogène de l'apo C-III par recombinaison homologue chez la souris a conduit à une diminution de la concentration plasmatique d'apo C-III et à une protection de l'animal vis-à-vis de l'hypertriglycéridémie postprandiale (10,11).

Les résultats d'études réalisées *in vivo* et *in vitro* indiquent que l'apo C-III agit principalement en retardant le catabolisme des particules riches en triglycérides soit en inhibant leur liaison à la surface de l'endothélium et la lipolyse subséquente par la lipoprotéine lipase, soit en interférant avec la clairance des particules résiduelles (remnants) assurée par le récepteur de l'apo E (12-16).

Enfin, l'importance de l'apo C-III dans le métabolisme des lipoprotéines est également suggérée par l'observation de plusieurs caractéristiques de l'hyperlipidémie familiale combinée (grande quantité de VLDL et de LDL associée à des maladies cardiaques et coronariennes précoces) chez les descendants de croisements entre des souris dont le gène du récepteur

des particules de faible densité (LDL) a été éliminé par recombinaison homologue et des souris surexprimant le gène humain de l'apo C-III (17).

5 Les récepteurs nucléaires Rev-erb forment une sous-famille de récepteurs nucléaires orphelins codés par au moins trois gènes distincts, Rev-
 10 erb α (ear1), Rev-erb β (BD73,ear4,RVR) et HZF-2 (18-25) dont les ligands naturels sont actuellement inconnus. L'ARNm codant pour le récepteur nucléaire Rev-erb α est
 15 exprimé dans de nombreux tissus, particulièrement dans le muscle, le tissu adipeux brun et le cerveau (26). L'expression du gène Rev-erb α est induite lors de la différenciation adipocytaire (26) et dans le foie en
 20 réponse à un traitement chronique aux fibrates (27). Les deux autres gènes sont notamment exprimés dans le cerveau (22,25). Rev-erb α et Rev-erb β se lient respectivement comme monomère sous la forme de deux
 25 monomères sur un élément de réponse constitué d'un demi-site PuGGTCA précédé d'une région de 5 paires de bases riche en A/T (A/T-A-A/T-N-T-A/G-G-G-T-C-A) (28, 21). Une
 30 liaison dimérique sur une répétition directe de deux demi-sites AGGTCA séparée de deux paires de bases et précédée d'une région riche en A/T a également été décrite *in vitro* (29). Contrairement à ce qui avait été
 initialement décrit (28), il semble que les récepteurs nucléaires de la sous-famille de Rev-erb répriment la transcription (29, 20). A ce jour, seulement trois
 cibles physiologiques ont été identifiées, l'oncogène N-myc (30), le gène de l'apo A-I de rat (27) et le récepteur nucléaire humain hRev-erb α lui-même (31)

35 Les travaux des Inventeurs ont permis de montrer que les récepteurs Rev-erb sont des régulateurs négatifs de la transcription du gène de l'apo C-III. Ces

récepteurs sont donc capables de réprimer la transcription du gène de l'apo C-III qui est lié au développement de l'hypertriglycémie et de l'hyperlipémie.

5

La présente invention concerne donc l'utilisation de récepteurs Rev-erb et/ou d'un de leur élément de réponse ou d'un équivalent fonctionnel de ceux-ci pour le criblage de substances utiles dans le traitement des dysfonctionnements du métabolisme lipidique.

10

Au sens de la présente invention, on désigne par récepteur Rev-erb, l'ensemble des isoformes α , β et γ de la famille Rev-erb

15

On entend par équivalent fonctionnel de Rev-erb toute protéine possédant à la fois :

- un site de fixation du ligand possédant une sélectivité comparable à celle de Rev-erb pour un ligand donné de celui-ci

20

et

- un site de fixation sur l'ADN reconnaissant le même élément de réponse que Rev-erb ou un élément de réponse possédant une séquence d'acides nucléiques proche.

25

On entend également par équivalent fonctionnel de Rev-erb une protéine chimère possédant :

- un site de fixation du ligand possédant une sélectivité comparable à celle de Rev-erb pour un ligand donné de celui-ci

30

et

- un site de fixation sur l'ADN reconnaissant un élément de réponse d'un gène rapporteur, ou un domaine protéique qui permet la purification aisée de la chimère et sa fixation spécifique à des matrices définie comme par exemple la

35

maltose binding protein (MBP) ou la glutathion-S-transférase (GST). Ce dernier type de chimère a été souvent utilisé (53). Il présente l'avantage de permettre une purification de la protéine en une étape par colonne d'affinité ou de séparer spécifiquement celle-ci par des procédures simples bien connues de l'homme du métier (couplage à des billes ou à des résines, élution par du maltose ou du glutathion..)

On entend par équivalent fonctionnel de l'élément de réponse du récepteur Rev-erb, toute séquence d'acide nucléique sur laquelle peut se fixer le récepteur Rev-erb et plus particulièrement une séquence dérivant de l'élément de réponse du récepteur Rev-erb.

On préfère plus particulièrement dans l'utilisation de l'invention le récepteur hRev-erb α l'ARN messager de hRev-erb α et l'élément de réponse du récepteur hRev-erb α .

La présente invention a donc pour objet un premier type de procédé de criblage de substances utiles dans le traitement des dysfonctionnements du métabolisme lipidique consistant à mettre en contact la substance à tester avec un récepteur de la famille Rev-erb et/ou un élément de réponse du récepteur Rev-erb, et/ou un facteur nucléaire capable de coupler fonctionnellement Rev-erb au complexe ARN-polymérase, ou un équivalent fonctionnel de ceux-ci, puis à mesurer par tout moyen approprié :

- la fixation de ladite substance sur le récepteur Rev-erb et/ou son équivalent fonctionnel ou la fixation du complexe formé de ladite substance et du récepteur Rev-erb sur son élément de réponse et/ou sur un facteur nucléaire capable de coupler fonctionnellement Rev-erb au complexe ARN-polymérase,,

et/ou

- la modulation de l'activité transcriptionnelle d'un gène placé sous le contrôle d'un promoteur comprenant ledit élément de réponse.

5

La mesure de la fixation de la substance sur le récepteur Rev-erb et/ou son équivalent fonctionnel ou la fixation du complexe formé de ladite substance et du récepteur Rev-erb sur son élément de réponse peut être
10 réalisée par toutes méthodes directes ou indirectes connues de l'homme du métier, comme celles utilisant un gène rapporteur, les tests de binding, ...

De la même manière, la mesure de la modulation de l'activité transcriptionnelle d'un gène placé sous le contrôle d'un promoteur comprenant l'élément de réponse de Rev-erb peut être réalisée par
15 toutes méthodes directes ou indirectes connues de l'homme du métier.

Afin de préciser l'utilité de la substance testée dans le traitement des dysfonctionnements du métabolisme lipidique, le procédé de l'invention comprend une étape supplémentaire visant à déterminer par tout moyen approprié l'effet de ladite substance sur l'expression de l'apo C-III. La détermination de l'effet
20 de la substance testée sur l'expression de l'apo C-III peut être réalisée par toutes méthodes directes ou indirectes connues de l'homme du métier, comme une transfection, une analyse des ARNm *in vitro* et sur des modèles *in vitro* et *in vivo*.
25

Un premier exemple de procédé de criblage selon la présente invention comprend les étapes suivantes :
30

a) on transfecte un hôte cellulaire avec un fragment d'ADN codant pour un récepteur Rev-erb ou l'un de ses équivalents fonctionnels,
35

b) on cotransfecte l'hôte de l'étape (a) avec une construction comprenant un élément de réponse dudit récepteur Rev-erb et au moins un gène rapporteur,

c) on mesure par tout moyen approprié l'expression du gène rapporteur en présence de la substance à tester.

L'élément de réponse mis en oeuvre à l'étape (b) pourra par exemple être constitué du fragment proximal du promoteur de l'apo C-III.

Tout gène rapporteur permettant de mesurer l'activité de récepteurs nucléaires sur la séquence comprenant leur élément de réponse peut être utilisé dans le procédé de criblage selon l'invention. Parmi ceux-ci, on peut citer par exemple le gène de la chloramphénicol acétyltransférase (CAT), le gène de la luciférase de luciole (Luc) ou de Renilla (Ren), le gène de la phosphatase alcaline sécrétée (PAS) ou celui de la bêta-galactosidase (β -Gal). L'activité des protéines codées par ces gènes peut être facilement mesurée par des méthode classiques et permet de connaître l'effet des récepteurs nucléaires sur l'expression des gènes en mesurant la quantité de protéines produite et ou leur activité enzymatique.

L'action des récepteurs Rev-erb et plus particulièrement du récepteur hRev-erb α sur le gène de l'apo C-III rapportée par les Inventeurs permet bien entendu d'utiliser, dans les constructions de l'invention et les procédés de criblages les mettant en oeuvre, le gène de l'Apo C-III comme gène rapporteur.

Dans le procédé de criblage de l'invention, on entend par hôte cellulaire, tout type cellulaire adapté à l'expression des gènes ci-dessus, comme notamment des cellules de mammifères, des bactéries ou

des levures ou encore des cellules d'insectes. Les vecteurs utilisés sont bien entendu adaptés au type cellulaire transfecté, on peut citer des plasmides, des virus ou des chromosomes artificiels.

5

Un autre exemple de ce premier type de procédé de criblage selon l'invention comprend les étapes suivantes:

10

a) on crée un plasmide qui comprend plusieurs copies d'un élément de réponse reconnu par Rev-erb comme par exemple un site RevDR2 du promoteur de Rev-erb α (31), le site consensus décrit par M. Lazar (28, 29), le site du promoteur apo C-III. Ces copies de l'élément de réponse sont clonées en amont d'un promoteur fort hétérologue comme le promoteur de la thymidine kinase du virus de l'Herpès Simplex, ou homologue comme le promoteur de l'apo C-III. Ce promoteur est lui même disposé de manière à contrôler l'expression d'un gène rapporteur comme la luciférase, la CAT, la phosphatase alcaline, la β -galactosidase,

20

25

b) on transfecte la construction de l'étape (a) dans des cellules qui expriment Rev-erb naturellement ou artificiellement, c'est à dire après cotransfection transitoire d'un vecteur d'expression ou création d'une lignée stable exprimant Rev-erb, et

c) on incube l'hôte de l'étape (c) en présence de la substance à tester,

d) on mesure par tout moyen approprié l'activité du gène rapporteur.

30

35

Les sites revDR2 sont des éléments de réponse de Rev-erb sur lesquels le récepteur se fixe pour moduler l'activité transcriptionnelle du gène placé en amont. Ces sites peuvent être utilisés pour conférer une sensibilité pour Rev-erb à un promoteur hétérologue.

Un exemple supplémentaire de ce premier type de procédé comprend les étapes suivantes :

- 5 a) on crée un plasmide qui comprend plusieurs copies d'un élément de réponse reconnu par Rev-erb clonés en amont d'un promoteur fort qui contrôle l'expression d'un gène de sélection suicidaire comme par exemple l'activateur d'une prodrogue toxique telle que la thymidine kinase du virus de l'Herpès (48),
- 10 b) on transfecte la construction de l'étape (a) dans un hôte cellulaire,
- c) on cotransfecte l'hôte de l'étape (b) à l'aide d'un vecteur exprimant Rev-erb et,
- 15 d) on incube l'hôte de l'étape (c) en présence de la substance à tester,
- e) on mesure par tout moyen approprié la survie cellulaire en présence de la prodrogue toxique.

20 La prodrogue toxique pourra par exemple être le ganciclovir

Encore un autre exemple de ce premier type de procédé comporte les étapes suivantes :

- 25 a) on crée un plasmide qui comprend plusieurs copies d'un élément de réponse reconnu par le facteur nucléaire de levure Gal4 clonés en amont d'un promoteur fort, comme le promoteur de la thymidine kinase du virus de l'Herpès Simplex, qui contrôle l'activité d'un gène rapporteur tel que la luciférase,
- 30 CAT, phosphatase alcaline, β -galactosidase, hormones de croissance,...
- b) on crée le plasmide d'une chimère qui comprend le domaine de liaison à l'ADN de Gal4 (49) et les domaines DEF de Rev-erb qui sont les domaines de
- 35 Rev-erb sur lesquels se fixent les ligands,

c) on cotransfecte les plasmides obtenus aux étapes (a) et (b) dans un hôte cellulaire et

d) on incube l'hôte de l'étape (c) en présence de la substance à tester,

5 e) on mesure par tout moyen approprié l'activité du gène rapporteur.

Les domaines DEF des récepteurs nucléaires divergent entre les différents membres de cette famille. Ils comprennent des séquences impliquées dans la transactivation de la transcription et la liaison des ligands et des cofacteurs. Les domaines DEF de Rev-erb sont combinés au fragment Gal4 qui contient les 147 premiers acides aminés de Gal4 pour créer une chimère Gal4-Rev-erbDEF qui se fixe sur l'élément de réponse à Gal4 et dont l'activité transcriptionnelle dépend des ligands et/ou des cofacteurs de Rev-erb (29)

15 L'activité de base de la chimère peut être augmentée par l'insertion d'un fragment d'ADN qui code pour tout ou partie de la protéine VP16 (50).

Le premier type de procédé de criblage peut encore se réaliser de la manière suivante:

25 a) on crée un plasmide qui comprend plusieurs copies d'un élément de réponse reconnu par le facteur nucléaire de levure Gal4 clonés en amont d'un promoteur fort qui contrôle l'expression d'un gène de sélection suicidaire, comme expliqué plus haut,

30 b) on crée une chimère qui comprend le domaine de liaison à l'ADN de Gal4 et les domaines DEF de Rev-erb,

c) on cotransfecte les plasmides obtenus aux étapes (a) et (b) dans un hôte cellulaire, et

35 d) on incube l'hôte de l'étape (c) en présence de la substance à tester,

e) on mesure par tout moyen approprié la survie cellulaire en présence de la prodrogue toxique.

5 L'activité de base de la chimère peut être augmentée par l'insertion d'un fragment d'ADN qui code pour tout ou partie de la protéine VP16 (50).

10 Un exemple supplémentaire de ce premier type de procédé de criblage consiste en l'évaluation quantitative des effets des composés testés dans des systèmes de type "double hybride" dans des levures ou d'autres cellules qui comprennent les fragments de Rev-
15 erb qui interagissent avec des cofacteurs et les fragments correspondant des cofacteurs (ex. : RIP13a, RIP13d1 (51), N-COR (52) ou éventuellement SMRT et P300/CBP) qui couplent Rev-erb à la machinerie transcriptionnelle et notamment au complexe ARN polymérase.

20 Un autre exemple de premier type de méthode de criblage selon l'invention consiste à évaluer de manière quantitative les effets des composés testés sur la capacité d'interaction *in vitro* entre la protéine hRev-erb α entière ou certains de ses fragments et des
25 cofacteurs ou certains de leurs fragments par toute technique connue de l'art du métier (par exemple par l'approche CARLA développée pour le criblage de ligand PPAR (53), méthode par mesure de transfert d'énergie de fluorescence par résonnance).

30 Un dernier exemple du premier type de procédé de criblage selon l'invention consiste à transformer un hôte cellulaire comme défini précédemment, avec une construction portant un gène
35 codant pour le récepteur Rev-erb ou son équivalent

fonctionnel et/ou un élément de réponse du récepteur Rev-erb, puis à utiliser lesdits hôtes cellulaires ou des extraits de ceux-ci dans des essais de "binding" fondés sur le déplacement compétitif entre un ligand froid et un ligand marqué.

La présente invention a également pour objet un deuxième type de procédé de criblage de substances utiles dans le traitement des dysfonctionnements du métabolisme lipidique consistant à déterminer l'effet de la substance à tester sur la modulation de l'expression de Rev-erb.

Un exemple de procédé de criblage basé sur la mesure de la modulation de l'expression de Rev-erb consiste à évaluer de manière directe l'effet de composés sur l'accumulation cellulaire de l'ARNm codant pour Rev-erb par hybridation *in situ* (technique Amersham), RPA, RT-PCR quantitative ou semi-quantitative, Dot Blot ou Northern Blot.

Un deuxième exemple de détermination de la modulation de l'expression de Rev-erb consiste à mesurer l'effet de la substance à tester sur l'expression cellulaire de la protéine Rev-erb par immunocytochimie, ELISA ou western blotting.

Un exemple supplémentaire de ce deuxième type de procédé consiste à évaluer de manière indirecte l'activité du promoteur du gène Rev-erb. Ce procédé comprend les étapes suivantes :

a) on crée un plasmide qui comprend le promoteur du gène de Rev-erb (31) cloné en amont d'un gène rapporteur tel qu'un gène luciférase, CAT, phosphatase alcaline, β -galactosidase, hormones de croissance, ... ou d'un gène de sélection comme un gène

de résistance à un antibiotique ou à un enzyme de conversion d'un précurseur non métabolisable,

- b) on transfecte un hôte cellulaire,
- c) on introduit la substance à tester,
- 5 d) on mesure par tout moyen approprié l'activité du gène rapporteur ou la survie cellulaire.

Le promoteur de Rev-erb contrôle l'expression du gène de Rev-erb et contient notamment un
10 élément de réponse à Rev-erb responsable d'une auto-inhibition de la transcription du gène. Des constructions comprenant des fragments de ce promoteur sont disponibles pour caractériser les facteurs impliqués dans la modulation de l'expression de ce gène.

15 Un exemple supplémentaire de procédé de mesure de la modulation de l'expression de Rev-erb consiste à mesurer l'activité du promoteur endogène du gène Rev-erb. Ce procédé comprend les étapes suivantes:

a) on crée un plasmide qui comprend
20 plusieurs copies d'un élément de réponse reconnu par Rev-erb clonés en amont d'un promoteur fort qui contrôle l'expression d'un gène de sélection suicidaire comme un activateur d'une prodrogue telle que la thymidine kinase du virus de l'Herpès, ou un gène rapporteur,

25 b) on transfecte la construction obtenue à l'étape(a) dans un hôte cellulaire,

c) on établit une lignée cellulaire stable qui exprime cette construction et qui exprime hRev-erb α et

30 d) on incube l'hôte de l'étape (b) ou (c) en présence de la substance à tester,

e) on mesure par tout moyen approprié la survie cellulaire en présence de la prodrogue toxique ou l'activité du gène rapporteur.

La présente invention a aussi pour objet les substances sélectionnées par une méthode de criblage selon la présente invention, ainsi que l'utilisation de ces substances pour la préparation d'une composition notamment pharmaceutique réprimant l'expression de l'apo C-III et donc destinée au traitement des dysfonctionnements du métabolisme lipidique chez l'homme ou l'animal. En effet, les composés possédant de telles propriétés sont sélectionnés sur la base de leur capacité à réprimer l'expression de l'apo C-III, et peuvent être des ligands de Rev-erb ou des analogues de Rev-erb, dont les propriétés sont mises en évidence soit directement à partir du niveau d'expression de l'apo C-III, soit par le biais de l'expression d'un gène rapporteur, ou encore par leur capacité à former un complexe avec le récepteur Rev-erb.

L'invention concerne donc plus généralement l'utilisation d'une substance capable de moduler l'expression de l'apo C-III pour la préparation d'une composition notamment pharmaceutique utile pour le traitement et/ou à la prévention des dysfonctionnements du métabolisme lipidique liés à l'apolipoprotéine C-III chez l'homme ou l'animal. Plus particulièrement l'invention se rapporte à l'utilisation d'une substance capable de se fixer au récepteur Rev-erb ou à son élément de réponse pour la préparation d'une composition pharmaceutique utile pour le traitement et/ou à la prévention des dysfonctionnements du métabolisme lipidique chez l'homme ou l'animal.

L'invention concerne encore l'utilisation d'une substance capable de moduler l'expression du gène codant pour le récepteur Rev-erb pour la préparation d'une composition notamment pharmaceutique utile pour le traitement et/ou la prévention des dysfonctionnements du

métabolisme lipidique lié à l'apolipoprotéine C-III chez l'homme ou l'animal.

Parmi les dysfonctionnements liés au métabolisme lipidique de l'apolipoprotéine C-III chez l'homme ou l'animal on peut citer l'hyper lipidémie, les complications liées au diabète, l'obésité, le syndrome X, ou la résistance à l'insuline et les maladies cardiaques et coronariennes.

D'autres avantages et caractéristiques de l'invention apparaîtront des exemples qui suivent décrivant la modulation de l'expression de l'apo C-III humaine par le récepteur hRev-erb α .

I. METHODES.

1. Culture cellulaire.

Les lignées HepG2 (hepatome humain) et RK13 (rein de lapin) proviennent de l'E.C.A.C.C. (Porton down, Salisbury, U.K.). Ces lignées ont été maintenues dans des conditions de culture standard (Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium, supplémenté de 10% de sérum de veau foetal, incubation à 37°C dans une atmosphère humide de 5% CO₂/95% air). Le milieu de culture est changé tous les deux jours.

2. Construction des plasmides recombinants.

L'activité du promoteur du gène de l'apo C-III a été étudiée selon les techniques classiques utilisant des gènes rapporteurs. Un fragment génomique qui comprend les séquences -1415/+24 du promoteur du gène de l'apo C-III humaine a été préparé par digestion avec les enzymes EcoRI et PvuII, rendu franc par

traitement au fragment de Klenow de l'ADN polymérase et
 cloné dans le site HincII du vecteur PUC18. Ensuite, le
 promoteur de l'apo C-III a été excisé par digestion avec
 HindIII et BamHI et sous-cloné dans les sites de
 5 restriction correspondants du vecteur pBLCAT5 (32) pour
 générer le plasmide -1415/+24 WT-hCIII-CAT. Le plasmide
 -1415/+24 C3Pmut-hCIII-CAT a été réalisé par mutagenèse
 dirigée du plasmide sauvage correspondant à l'aide du
 système Amersham de mutagenèse in vitro basé sur la
 10 méthode de Nakayama et Eckstein (33). Pour ce faire, un
 oligonucléotide couvrant la région -58/-80 du promoteur
 du gène de l'apo C-III humaine et comprenant deux
 mutations ponctuelles (5'-TGA CCT TTG CTG AGC GCC CTG
 GG-3') a été hybridé au fragment simple brin -1415/+24
 15 du promoteur de l'apo C-III humaine sous-cloné dans le
 bactériophage M13mp18. Les plasmides -198/+24 WThCIII-
 CAT et -198/+24 C3PmuthCIII-CAT comprenant le fragment
 proximal du promoteur de l'apo C-III humaine ont été
 obtenus par digestion des plasmides -1415/+24WThCIII-CAT
 20 et -1415/+24 C3Pmut-hCIII-CAT par PstI et religation.
 Afin de transférer le gène rapporteur Luc+ dans les
 constructions décrites précédemment, le gène rapporteur
 luciférase Luc+ du vecteur rapporteur pGL3 (Promega) a
 été excisé par les enzymes SacI et BamHI et sous-cloné
 25 dans les sites correspondants du vecteur
 pBKCMV(Stratagene) pour donner le vecteur pBKCMV-Luc+.
 Le gène rapporteur CAT des constructions -
 1415/+24WThCIII-CAT, -1415/+24 C3Pmut-hCIII-CAT, -
 198/+24 WThCIII-CAT et -198/+24 C3PmuthCIII-CAT a été
 30 excisé par les enzyme KpnI et BamHI et remplacé par le
 gène rapporteur Luc+ obtenu par digestion du plasmide
 pBKCMV-Luc+ par les enzymes BglII et KpnI pour donner
 les plasmides -1415/+24 WThCIII-Luc+, -1415/+24
 C3PmuthCIII-Luc+, -198/+24WThCIII-Luc+ et -
 35 198/+24C3PmuthCIII-Luc+. Le plasmide Tk-Luc+ a été

construit en insérant le gène rapporteur Luc⁺ obtenu par digestion du plasmide pBKCMV-Luc⁺ avec les enzymes BglII et KpnI dans le vecteur pBLCAT4 (32) coupé par BglII et KpnI à la place du gène rapporteur CAT. Les fragments -
 5 1415/+24 et -198/+24 du promoteur de l'apo C-III ont également été amplifiés par PCR en utilisant une amorce 5' qui transforme le site HindIII du vecteur pBLCAT5 en un site NheI (5'-ACG GCC AGT TGC TAG CTT GCA TGC CTG C-3'), une amorce 3' qui s'hybride au début du gène
 10 rapporteur Luc⁺ (5'-TAT GCA GTT GCT CTC CAG CGG TTC CAT CTT CC-3') et les plasmides -1415/+24 WThCIII-Luc⁺ et -198/+24WThCIII-Luc⁺ comme matrice. Les fragments PCR obtenus ont été digérés par HindIII et NheI et insérés dans les sites correspondants du vecteur pGL3. Le
 15 plasmide pTk-pGL3 a été construit en amplifiant par PCR le fragment du promoteur de la thymidine kinase du virus de l'Herpès Simplex présent dans le plasmide pBLCAT4 à l'aide des amorces suivantes 5'-CGA CTC TAG AAG ATC TTG CCC CGC CCA GCG-3' et 5'-TCG CCA AGC TTC TCG TGA TCT GCG
 20 GCA-3', en digérant le fragment PCR obtenu par les enzymes BglII et HindIII et en l'insérant dans les sites correspondants du vecteur pGL3. Toutes les constructions ont été vérifiées par séquençage.

Les plasmides pSG5-hRev-erb α (31) et pCMX-hROR α (34) permettant l'expression exogène des récepteurs nucléaires correspondant ont été transmis par V. Laudet et par V. Giguère, respectivement. Le plasmide pSG5-hHNF4 a été obtenu et décrit dans notre laboratoire (35).

3. Transfection transitoire et mesure d'activité du promoteur de l'apo C-III humaine.

L'activité des récepteurs nucléaires a été mesurée par des techniques classiques de gène rapporteur/cotransfection. L'ADN a été introduit dans
 35

les cellules étudiées par les technologies courantes disponibles au laboratoire (phosphate de calcium, Électroporation, lipofection,...). Les vecteurs pSG5 et pCMX ont été utilisés comme contrôles négatifs. Dans les expériences présentées, les cellules ont été transfectées à 50-60% de confluence par la technique de précipitation au phosphate de calcium avec un mélange de plasmides qui comprenait en plus des plasmides rapporteur Luc+ ou pGL3 (0.5 µg/ boîte de 60 mm) et des vecteurs d'expression pSG5-hRev-erb α , pSG5-hHNF4 et pCMX-hROR α (0.1-1 µg/ boîte de 60 mm), 0.1 µg/ boîte de 60 mm du plasmide pCMV- β -gal (Clontech) comme contrôle d'efficacité de transfection (36). Après 5 à 6-heures, les cellules étaient lavées deux fois au PBS et incubées pendant 36 heures dans du milieu de culture frais contenant 10% de sérum de veau foetal. Après la transfection, les cellules étaient lysées et les activités luciférase et β -gal étaient mesurées selon des protocoles classiques (37).

4. Expériences in vivo.

Des souris dont le gène Rev-erb a été détruit par recombinaison homologue (Rev-erb KO) ont été obtenues par Björn Vennström (Lab. of Developmental Biology, CMB, Karolinska Institute, Stockholm, Suède) (fond SV129 croisé avec un fond BalbC). Nous avons obtenu de Björn Vennström des prélèvements sanguins et des échantillons de foie de souris transgéniques Rev-erb KO ou normales soumises à des régimes Chow ou enrichis en cholestérol (2%).

5. Analyse des paramètres sanguins.

Les concentrations lipidiques sériques ont été déterminées par dosage colorimétrique en utilisant les dosages enzymatiques disponibles chez Boehringer Mannheim. Pour établir les profils FPLC (fast protein liquid chromatography), un pool de 200 μ l de sérum représentatif de la moyenne a été injecté sur une colonne Superose 6HR 10/30 préconditionnées (Pharmacia, Uppsala, Suède) et éluées à débit constant (0,2 ml/min.) avec du PBS pH 7,4. La densité optique des éluats était mesurée à 280 nm avant qu'ils ne soient récoltés par fraction de 0,27 ml. Le cholestérol et les triglycérides étaient ensuite dosés dans 0,1 ml de chaque fraction (dosage Boehringer). Des volumes équivalents de plasma de souris transgéniques ou témoins ont également été déposés sur gel de polyacrylamide afin de séparer les protéines sériques par électrophorèse. L'identité des protéines révélées par coloration au bleu de Coomassie a été vérifiée par immuno-blotting.

6. Analyse des ARN.

Les extractions d'ARN hépatique des souris transgéniques, la préparation et l'hybridation des Northern et Dot Blots et les mesure des niveaux d'ARNm apo C-III ont été effectués selon les protocoles décrits précédemment (38). Les ADNc du clone 36B4 codant pour la phosphoprotéine ribosomale acide PO humaine (39), la GAPDH (40) ou la β -actine (41) ont été utilisés comme contrôle. Les sondes ADNc ont été marquées au 32 P en utilisant des amorces aléatoires grâce au kit distribué par Boehringer Mannheim. Les membranes ont été hybridées avec 1.5×10^6 cpm/ml de chaque sonde selon le protocole décrit précédemment (42). Elles ont été lavées une fois dans un tampon 0.5x SSC et 0.1% SDS à température ambiante pour 10 min et deux fois dans le même tampon à

65°C pendant 30 min et ensuite autoradiographiées (film X-OMAT-AR, Kodak). Les autoradiographies ont été analysées par densitométrie (Densitomètre Biorad GS670). Les résultats ont été normalisés relativement aux niveaux des ARNms des sondes contrôles utilisées(42).

7. Retards sur gel.

Les protéines hRev-erb α et hROR α ont été synthétisées *in vitro* au départ des plasmides pSG5-hRev-erb α et pCMX-hROR α à l'aide de lysats de réticulocyte à l'aide du kit "TnT T7 quick coupled transcription/translation system" de Promega. Les expériences de retard sur gel ont été réalisées selon le protocole décrit précédemment (43, 44) en utilisant des oligonucléotides double brin phosphorylés aux extrémités par la polynucléotide-kinase en présence d'ATP γ ³²P.

Les séquences des oligonucléotides utilisés sont les suivantes :

RevDR2 = site Rp: élément de réponse à Rev-erb présent dans le promoteur de hRev-erb α (31)

oligo sens : 5'-GAT CCG GAA AAG TGT
GTC ACT GGG GCA CGA-3'

oligo antisens : 5'-GAT CTC GTG CCC CAG
TGA CAC ACT TTT CCG-3'

RORE = site de fixation consensus pour les récepteurs nucléaires ROR et Rev-erb (45)

oligo sens : 5'-GAT CCA GCT TAG AAT
GTA GGT CAA-3'

oligo antisens : 5'-GAT CTT GAC CTA CAT
TCT AAG CTG-3'

rAI-TATA-wt = boîte TATA du promoteur de l'apo A-I de rat (45)

oligo sens : 5'-GAT CCA CAC ATA TAT
AGG TCA GGG AAG AAG A-3'

oligo antisens : 5'-GAT CTC TTC TTC CCT
GAC CTA TAT ATG TGT G-3'

rAI-TATA-mut = boîte TATA mutée du promoteur
de l'apo AI de rat (45)

5 oligo sens : 5'-GAT CCA CAC ATA TAT
AGG CAG GGA AGA AGA-3'

oligo antisens : 5'-GAT CTC TTC TTC CCT
GCC TAT ATA TGT GTG-3'

10 hCIII-TATA-wt = boîte TATA du promoteur de
l'apo C-III humaine (position -32/+3)

oligo sens : 5'-GAT CTG ATA TAA AAC
AGG TCA GAA CCC TCC-3'

oligo antisens : 5'-GAT CGA GGG TTC TGA
CCT GTT TTA TAT CA-3'

15 C3P-DR2 = DR2 potentiel du promoteur de
l'apo C-III humaine (-103/-71)

oligo sens : 5'-GAT CCT CAT CTC CAC
TGG TCA GCA GGT GAC CTT TGC-3'

20 oligo antisens : 5'-GAT CGC AAA GGT CAC
CTG CTG ACC AGT GGA GAT GAG-3'

C3P-DR1 = site C3P du promoteur de l'apo C-
III humaine (-88/-62)

oligo sens : 5'-GAT CTC AGC AGG TGA
CCT TTG CCC AGC GCC C-3'

25 oligo antisens : 5'-GAT CGG GCG CTG GGC
AAA GGT CAC CTG CTG A-3'

30 Les oligo double brin ont été obtenus en
incubant 2,5 ou 5 µg des oligonucléotides sens et
antisens dilués dans un tampon d'hybridation (Tris-HCl
pH8 50 mM, KCl 50 mM, MgCl₂ 5 mM, DTT 10 mM) chauffés à
100°C pendant 10 min ensuite à 65°C pendant 10 min et en
refroidissant lentement le mélange à température
ambiante .

Les tampons de liaison avaient les compositions suivantes:

5 Tampon 1 : Hepes 10 mM, KCl 50 mM, glycérol 1 %, MgCl₂ 2,5 mM, DTT 1,25 mM, polydIdC 0,1 µg/µl, ADN de sperme de hareng 50 ng/µl, albumine sérique bovine 1µg/µl, lysat de réticulocyte : 10%.

10 Tampon 2 : Hepes 10 mM, KCl 80 mM, glycérol 5%, DTT 10 mM, polydIdC 0,1 µg/µl, ADN de sperme de hareng 50 ng/µl, albumine sérique bovine 1µg/µl, lysat de réticulocyte : 10%.

15 Lors des expériences de compétition, des concentrations croissantes d'oligonucléotides double brin non marqués (excès molaire de 50 à 100 fois) étaient ajoutées aux mélanges et incubés 15 min à température ambiante avant l'addition des sondes radioactives. Après addition des sondes radioactives, les lysats de réticulocytes étaient incubés 15 min à température ambiante et les complexes protéine/ADN
20 étaient séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (4%) dans un tampon TBE 0.25X à température ambiante (46).

II. Résultats.

1. hRev-erb α réduit l'activité du promoteur de l'apo C-III humaine dans les cellules HepG2.

5 Lorsque des cellules HepG2 cotransfectées avec un plasmide comprenant un large fragment du promoteur de l'apo C-III humaine en amont du gène rapporteur Luc (-1415/+24WThCIIILuc+) sont transfectées avec le plasmide pSG5-hRev- α qui permet l'expression
10 exogène du récepteur nucléaire Rev-erb α , une réduction dose-dépendante de l'activité du gène rapporteur est observée (figure 1).

15 Ces résultats suggèrent la présence d'un élément de réponse puissant au récepteur nucléaire hRev-erb α dans le promoteur de l'apo C-III humaine capable de réduire considérablement l'activité de ce promoteur.

20 2. hRev-erb α réprime l'activité du promoteur de l'apo C-III dans d'autres cellules.

 Afin de vérifier si la répression de l'activité du promoteur de l'apo C-III humaine par le récepteur nucléaire hRev-erb α dépend du contexte
25 cellulaire et d'identifier un modèle cellulaire plus pratique à utiliser, les expériences précédentes ont été reproduites avec des cellules RK13. Ces expériences ont produit des résultats similaires (figure 2). Ce modèle a été utilisé par la suite du fait de la stabilité de son
30 phénotype.

35 3. L'effet du récepteur nucléaire hRev-erb α est spécifique du promoteur de l'apo C-III humaine.

Afin d'établir la spécificité de l'effet du récepteur nucléaire hRev-erb α sur le promoteur de l'apo C-III humaine, son activité a été comparée sur d'autres promoteurs (promoteur de la thymidine kinase du virus de l'Herpes Simplex, et dans deux contextes plasmidiques (pGL3 et pBLCAT5). La répression de l'expression du gène rapporteur Luc+ ne s'observe que si celui-ci est précédé de promoteurs spécifiques. Il n'est pas observé en l'absence de promoteurs ou avec le promoteur de la thymidine kinase du virus de l'Herpes Simplex ou le promoteur du virus de SV40 (figure 3). L'effet du récepteur nucléaire hRev-erb α est spécifique.

4. L'effet du récepteur nucléaire hRev-erb α sur l'activité du promoteur de l'apo C-III humaine est dominant.

Plusieurs membres de la superfamille des récepteurs nucléaires aux hormones à laquelle appartient hRev-erb α reconnaissent des éléments de réponse propres au niveau du promoteur de l'apo C-III humaine : HNF4, le complexe PPAR/RXR, ARP1 et COUPTF se fixent sur le site C3P (-58/-80) (47) et modulent l'activité du promoteur de l'apo C-III humaine. Afin d'établir dans quelle mesure hRev-erb α influence l'action d'autres récepteurs nucléaires aux hormones, des cellules RK13 ont été cotransfectées avec une quantité fixe de plasmide rapporteur et des plasmides permettant l'expression exogène des récepteurs hHNF4 ou hROR α et des quantités croissantes de plasmide permettant l'expression exogène de hRev-erb α . Quel que soit le récepteur nucléaire cotransfecté, hRev-erb α diminue l'activité du gène rapporteur en dessous du niveau de base : l'effet de hRev-erb α est dominant (figure 4, 5).

5. Evaluation de la pertinence physiologique de la modulation par Rev-erb de l'expression de l'apo C-III.

5 Afin d'établir la pertinence physiologique des observations réalisées *in vitro* décrites plus haut, l'effet de la destruction par recombinaison homologue du gène Rev-erb α dans des souris C57/BL6 a été évalué sur les paramètres sanguins (taux plasmatique de triglycérides et de cholestérol, profil lipidique),
10 l'accumulation hépatique des ARN messagers codant pour l'apo C-III et l'accumulation d'apo C-III dans les lipoprotéines d'animaux normaux et transgéniques sous régime normal ou enrichi en cholestérol (2%).

a. Paramètres sanguins.

Une augmentation importante de la concentration de triglycérides dans les fractions à faible temps d'élution (VLDL) a été observé dans les souris mutantes par rapport aux souris normales, quel que soit le régime étudié (figure 6).

b. Expression du gène de l'apo C-III.

L'expression de l'ARNm codant pour l'apo C-III est accrue dans les souris dont le gène Rev-erb α a été détruit par recombinaison homologue (figure 7)

c. Expression et sécrétion de la protéine.

L'accumulation d'apo C-III dans le plasma révélée par électrophorèse unidimensionnelle en gel de polyacrylamide est accrue dans les souris dont le gène Rev-erb α a été détruit par recombinaison homologue (figure 8)

Ces résultats montrent que des modifications de l'expression de Rev-erb affectent les taux plasmatiques de triglycérides chez la souris : nos observations sont physiologiquement pertinentes.

6. Identification du (des) site(s) de liaison de hRev-erb α sur le promoteur de l'apo C-III humaine.

a. Evaluation de la fixation in vitro de hRev-erb α sur des fragments du promoteur de l'apo C-III humaine. L'analyse comparative des séquences des promoteurs humains et murins de l'apo C-III a permis d'identifier plusieurs sites potentiels de fixation de

hRev-erb α , bien qu'aucun d'eux ne corresponde parfaitement au consensus décrit (28).

La fixation de hRev-erb α sur des fragments
 5 du promoteur de l'apo C-III humaine et sur des sites de
 fixations décrits préalablement dans la littérature a
 été évaluée par la technique de retard sur gel. Une
 fixation très faible dans les conditions utilisées de
 hRev-erb α a été observé sur un oligonucléotide double
 10 brin dont la séquence correspond à celle de la boîte
 TATA (-32/+3) du promoteur de l'apo C-III humaine
 (figure 9). Une meilleure fixation est observé dans un
 autre tampon (figure 10). Une fixation plus intense est
 observée, quel que soit le tampon utilisé, sur des
 15 oligonucléotides doubles brins dont les séquences
 correspondent au site consensus décrit (RORE), à la
 boîte TATA du gène de l'apo A-I de rat sur laquelle se
 fixe Rev-erb α (45) et sur le site Rev-DR2 du promoteur
 du gène hRev-erb α . Aucune liaison significative n'a été
 20 observée sur les oligonucléotides double brin dont les
 séquences correspondent aux fragments et du promoteur de
 l'apo C-III humaine (site C3P(-88/-62) et DR-2 potentiel
 chevauchant le site C3P (-103/ -71)).

25 7. Equivalences fonctionnelles des récepteurs Rev-erb β sur le promoteur de l'apo C-III.

La répression de l'expression du gène
 30 rapporteur Luc+ sous contrôle du promoteur du gène
 humain de l'apo C-III par Rev-erb α est reproduite par
 Rev-erb β (poulet et rat) et Rev-erby (HZF-2 : zebra
 fish). Ces résultats sont illustrés sur la figure 11.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Curry, M. D., W. J. McConathy, J. D. Fesmire, and P. Alaupovic. 1980. Quantitative determination of human apolipoprotein C-III by electroimmunoassay. *Biochim. Biophys. Acta.* 617:503-513.
2. Schonfeld, G., P. I. Georges, J. Miller, P. Reilly, and J. Witztum. 1979. Apolipoprotein C-II and C-III levels in hyperlipoproteinemia. *Metabolism.* 28:1001-1009.
3. Stocks, J., G. Holdsworth, and D. J. Galton. 1979. Hypertriglyceridaemia associated with an abnormal triglyceride-rich lipoprotein carrying excess apolipoprotein C-III. *Lancet.* ii:667-671.
4. Le, N.-A., J. C. Gibson, and H. N. Ginsberg. 1988. Independent regulation of plasma apolipoprotein C-II and C-III concentrations in very low density and high density lipoproteins: implications for the regulation of the catabolism of these lipoproteins. *J. Lipid Res.* 29:669-677.
5. Luc, G., C. Fievet, D. Arveiler, A. E. Evans, J.-M. Bard, F. Cambien, J.-C. Fruchart, and P. Ducimetiere. 1996. Apolipoproteins C-III and E in apoB- and non-apoB-containing lipoproteins in two populations at contrasting risk for myocardial infarction: the ECTIM study. *J. Lipid Res.* 37:508-517.
6. Malmendier, C. L., J.-F. Lontie, C. Delcroix, D. Y. Dubois, T. Magot, and L. De Roy. 1989. Apolipoproteins C-II and C-III metabolism in hypertriglyceridemic patients. Effect of a drastic

triglyceride reduction by combined diet restriction and fenofibrate administration. *Atherosclerosis*. 77:139-149.

5 7. Ginsberg, H. N., N.-A. Le, I. J. Goldberg, J. C. Gibson, A. Rubinstein, P. Wang-Iverson, R. Norum, and W. V. Brown. 1986. Apolipoprotein B metabolism in subjects with deficiency of apolipoproteins CIII and AI: evidence that apolipoprotein CIII inhibits catabolism of triglyceride-rich lipoproteins by lipoprotein lipase in vivo. *J. Clin. Invest.* 78:1287-1295.

15 8. Dammerman, M., L. A. Sandkuijl, J. L. Halaas, W. Chung, and J. L. Breslow. 1993. An apolipoprotein CIII haplotype protective against hypertriglyceridemia is specified by promoter and 3' untranslated region polymorphisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 90:4562-4566.

20 9. Rees, A., C. C. Shoulders, J. Stocks, D. J. Galton, and F. E. Baralle. 1983. DNA polymorphism adjacent to human apoprotein A-I gene: relation to hypertriglyceridemia. *Lancet*. i:444-446.

25 10. Maeda, N., H. Li, D. Lee, P. Oliver, S. H. Quarfordt, and J. Osada. 1994. Targetted disruption of the apolipoprotein C-III gene in mice results in hypertriglyceridemia and protection from postprandial hypertriglyceridemia. *J. Biol. Chem.* 269:23610-23616.

30 11. Ito, Y., N. Azrolan, A. O'Connell, A. Walsh, and J. L. Breslow. 1990. Hypertriglyceridemia as a result of human apo CIII gene expression in transgenic mice. *Science*. 249:790-793.

12. de Silva, H. V., S. J. Lauer, J. Wang, W. S. Simonet, K. H. Weisgraber, R. W. Mahley, and J. M. Taylor. 1994. Overexpression of human apolipoprotein C-III in transgenic mice results in an accumulation of apolipoprotein B48 remnants that is corrected by excess apolipoprotein E. *J. Biol. Chem.* 269:2324-2335.

13. Aalto-Setälä, K., E. A. Fisher, X. Chen, T. Chajek-Shaul, T. Hayek, R. Zechner, A. Walsh, R. Ramakrishnan, H. N. Ginsberg, and J. L. Breslow. 1992. Mechanism of hypertriglyceridemia in human apolipoprotein (apo) CIII transgenic mice. Diminished very low density lipoprotein fractional catabolic rate associated with increased apo CIII and reduced apo E on the particles. *J. Clin. Invest.* 90:1889-1900.

14. Clavey, V., S. Lestavel-Delattre, C. Copin, J. M. Bard, and J. C. Fruchart. 1995. Modulation of lipoprotein B binding to the LDL receptor by exogenous lipids and apolipoproteins CI, CII, CIII, and E. *Arterioscler. Throm. Vasc. Biol.* 15:963-971.

15. Aalto-Setälä, K., P. H. Weinstock, C. L. Bisgaier, L. Wu, J. D. Smith, and J. L. Breslow. 1996. Further characterization of the metabolic properties of triglyceride-rich lipoproteins from human and mouse apo C-III transgenic mice. *J. Lipid Res.* 37:1802-1811.

16. Ebara, T., R. Ramakrishnan, G. Steiner, and N. S. Shachter. 1997. Chylomicronemia due to apolipoprotein CIII overexpression in apolipoprotein E-null mice. Apolipoprotein CIII-induced hypertriglyceridemia is not mediated by effects on apolipoprotein E. *J. Clin. Invest.* 99:2672-2681.

17. Masucci-Magoulas L, Goldberg I, Bisgaier C, Serajuddin H, Francone O, Breslow J, Tall A. 1997. A mouse model with features of familial combined hyperlipidemia. *Science*. 275: 391-394

5

18. Miyajima N, Horiuchi, R., Shibuya, Y., Fukushima, S.-i., Matsubara, K.-i., Toyoshima, K. and Yamamoto, T. (1989) Two erbA homologs encoding proteins with different T3 binding capacities are transcribed from opposite DNA strands of the same genetic locus. *Cell*, 57, 31-39.

10

19. Lazar, M.A., Hodin, R.A., Darling, D.S. and Chin, W.W. (1989) A novel member of the thyroid/steroid hormone receptor family is encoded by the opposite strand of the rat c-erbAa transcriptional unit. *Mol. Cell. Biol.*, 9, 1128-1136.

15

20. Forman B, Chen J, Blumberg B, Klierer SA, Henshaw R, Ong ES, Evans R. Cross-talk among ROR α and the Rev-erb family of nuclear receptor. *Mol. Endocrinol.* 8:1253

20

21. Dumas B, Harding HS, Choi K, Lehman M, Chung M, Lazar MA, Moore D 1994. A new orphan member of the nuclear hormone receptor superfamily closely related to Rev-Erb. *Mol Endocrinol.* 8:996

25

22. Pena de Ortiz S et Jamieson GA Jr 1997 Molecular cloning and brain localization of HZF-2 α , a new member of the rev-erb subfamily of orphan nuclear receptors. *J. Neurobiol* 32, 341-358.

30

23. Enmark E, Kainu M, Pelta Huikko M, Gustafsson JA 1994. Identification of a novel member of

35

the nuclear receptor superfamily which is closely related to rev-erbA Biochem Biophys Res Commun. 204: 49-56

5 24. Retnakaran, R., Flock, G. and Giguère, V. (1994) Identification of RVR, a novel orphan nuclear receptor that acts as a negative transcriptional regulator. Mol. Endocrinol., 8, 1234-1244.

10 25. Bonnelye, E., Vanacker, J.M., Desbiens, X., Begue, A., Stehelin, D. and Laudet, V. (1994) Rev-erbB, a new member of the nuclear receptor family is expressed in the nervous system during chicken development. Cell Growth Differentiation, 5, 1357-1365.

15 26. Chawla, A. and Lazar, M.A. (1993) Induction of Rev-ErbAa, an orphan receptor encoded on the opposite strand of the α -thyroid hormone receptor gene, during adipocyte differentiation. J. Biol. Chem., 268, 16265-16269.

20

25 27. Ngoc Vu-Dac Chopin-Delannoy S, Gervois P, Bonnelye E, Schoonjans K, Auwerx J, Fruchart J-C, Laudet V et Staels B. 1998 The nuclear receptor PPAR α and Rev-erba mediate the species-specific regulation of apolipoprotein A-I expression by fibrates soumis pour publication.

30 28. Harding HP and Lazar MA 1993. The orphan receptor Rev-ErbAa activates transcription via a novel response element. Mol. Cell Biol 13:3113

29. Harding, H.P. and Lazar, M.A. (1995) The monomer-binding orphan receptor Rev-erb represses

transcription as a dimer on a novel direct repeat. *Mol. Cell. Biol.*, 15, 4791-4802.

5 30. Dussault, I. and Giguère, V. (1997)
Differential regulation of the N-myc proto-oncogene by
RORa and RVR, two orphan members of the superfamily of
nuclear hormone receptors. *Mol. Cell. Biol.*, 17, 1860-
1867.

10 31. Adelmant G., Bègue, A., Stéhelin, D. and
Laudet, V. (1996) A functional Rev-erba responsive
element located in the human Rev-erba promoter mediates
a repressing activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93,
3553-3558.

15 32. Luckow, B., and G. Schütz. 1987. CAT
constructions with multiple unique restriction sites for
the functional analysis of eukaryotic promoters and
regulatory elements. *Nucl. Acids Res.* 15:5490.

20 33. Nakamaye, K. L., and F. Eckstein. 1986.
Inhibition of restriction nuclease NciI cleavage by
phosphorothiolate groups and its application to
oligonucleotide-directed mutagenesis. *Nucl. Acids Res.*
25 14:9679-9698.

30 34. Giguère, V., Tini, M., Flock, G., Ong,
E., Evans, R. M., and Otulakowski, G. (1994) Isoform-
specific amino-terminal domains dictate DNA-binding
properties of RORa, a novel family of orphan nuclear
receptors *Genes Dev.* 8, 538-553

35 35 .Chartier F, Bossu JP, Laudet V, Fruchart
JC, Laine B. 1994. Cloning and sequencing of cDNAs
encoding the human hepatocyte nuclear factor 4 indicate

the presence of two isoforms in human liver. *Gene*. 147:269-272.

36. MacGregor, G. R., and C. T. Caskey. 1989. Construction of plasmids that express *E. coli* β -galactosidase in mammalian cells. *Nucl. Acids Res.* 17:2365.

37. Ausubel F, Brent R, Kingston R, Moore D, Smith J, Seidman G, Struhl K 1987. *Current protocols in molecular biology*, Greene Publishing - Wiley Interscience, New York.

38. Staels, B., N. Vu-Dac, V. A. Kosykh, R. Saladin, J. C. Fruchart, J. Dallongeville, and J. Auwerx. 1995. Fibrates downregulate apolipoprotein C-III expression independent of induction of peroxisomal Acyl Coenzyme A Oxidase. *J. Clin. Invest.* 95:705-712.

39. Masiakowski, P., R. Breathnach, J. Bloch, F. Gannon, A. Krust, and P. Chambon. 1982. Cloning of cDNA sequences of hormone-regulated genes from MCF-7 human breast cancer cell line. *Nucl. Acids Res.* 10:7895-7903.

40. Dugaiczyk A, Haron J, Stone E, Dennison O, Rothblum K, Schwartz R. 1983. Cloning and sequencing of a deoxyribonucleic acid copy of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase messenger ribonucleic acid isolated from chicken muscle. *Biochem.* 29: 1605-1613.

41. Cleveland D, Lopata M, MacDonald R, Cowan N, Rutter W, Kirschner M. 1980. Number and evolutionary conservation of alpha- and beta-tubulin

and cytoplasmic beta- and gamma-actin genes using specific cloned cDNA probes. Cell 20:95-105 b-actin.

- 5 42. Staels, B., and J. Auwerx. 1992. Perturbation of developmental gene expression in rat liver by fibric acid derivatives: lipoprotein lipase and alpha-fetoprotein as models. Development. 115:1035-1043.
- 10 43. Vanacker, J.M., Laudet, V., Adelmant, G., Stéhelin, D. and Rommelaere, J. (1993) Interconnection between thyroid hormone receptor signalling pathways and parvovirus cytotoxic functions. J. Virol., 67, 7668-7672.
- 15 44. Vu-Dac, N., Schoonjans, K., Laine, B., Fruchart, J.C., Auwerx, J. and Staels, B. (1994) Negative regulation of the human apolipoprotein A-I promoter by fibrates can be attenuated by the interaction of the peroxisome proliferator-activated
20 receptor with its response element. J. Biol. Chem., 269, 31012-31018.
- 25 45. Vu-Dac N, Gervois P, Gr[^]tzinger T, De Vos P, Schoonjans K, Fruchart J-C, Auwerx J, Mariani J, Tedgui A, Staels B. 1997, Transcriptional regulation of Apolipoprotein A-I gene expression by the nuclear receptor ROR α J. Biol. Chem., 272, 22401-22404.
- 30 46. Fried, M.G. and Crothers, D.M. (1983) CAP and RNA polymerase interactions with the lac promoter: binding stoichiometry and long range effects. Nucl. Acids Res., 11, 141-158.
- 35 47. Ladas, J.A.A., Hadzopoulou-Cladaras, M., Kardassis, D., Cardot, P., Cheng, J., Zannis, V. and

Cladaras, C. (1992) Transcriptional regulation of human apolipoprotein genes apoB, apoCIII, and apoAII by members of the steroid hormone receptor superfamily HNF-4, ARP-1, EAR-2, and EAR-3. *J. Biol. Chem.*, 267, 15849-15860.

48. Moolten F 1994, Drug sensitivity (suicide) genes for selective cancer chemotherapy. *Cancer Gene Ther.* 1: 125-134

49. Webster et al, *Cell*, 52, 169-178

50. Sadowski, I, Ma J, Triezenberg S, Ptashme M. 1988. Gal4-VP16 is an unusually potent transcriptional activator. *Nature* 335, 563-564.

51. Zamir I, Harding H, Atkins G, Horlein A, Glass C, Rosenfeld M, Lazar M. 1996. A nuclear receptor corepressor mediates transcriptional silencing by receptors with distinct repression domains. *Mol. Cell. Biol.* 16: 5458-5465

52. Downes M, Burke L, Bailey P, Muscat G 1996. Two receptor interactions domains in the corepressor, N-COR/RIP13, are required for an efficient interaction with Rev-erbA alpha and RVR: physical association is dependent on the E region of the orphan receptors. *Nucleic Acid Res.* 24, 4379-4386.

52. Krey G, Braissant O, LiHorset F, Kalkhoven E, Perroud M, Parker M, Wahli W. 1997. Fatty acids, Eicosanoids, and hypolipidemic agents identified as ligands of Peroxisome Proliferator-activated Receptors by Coactivator-Dependent Receptor Ligand Assay. *Mol. Endocrinol.* 11: 779-791.

REVENDICATIONS

5 1) Utilisation des récepteurs Rev-erb et/ou
de leur élément de réponse ou d'un équivalent
fonctionnel de ceux-ci pour le criblage de substances
utiles dans le traitement des dysfonctionnements du
métabolisme lipidique.

10 2) Utilisation selon la revendication 1,
caractérisée en ce que le récepteur Rev-erb et l'élément
de réponse du récepteur Rev-erb sont le récepteur hRev-
erb α et l'élément de réponse du récepteur hRev-erb α .

15 3) Procédé de criblage de substances utiles
dans le traitement des dysfonctionnements du métabolisme
lipidique caractérisé :

20 - en ce que l'on met en contact la substance
à tester avec un récepteur de la famille Rev-erb et/ou
un élément de réponse du récepteur Rev-erb, et/ou un
facteur nucléaire capable de coupler fonctionnellement
Rev-erb au complexe ARN-polymérase, ou un équivalent
fonctionnel de ceux-ci,

 - en ce que l'on mesure par tout moyen
approprié :

25 - la fixation de ladite substance
sur le récepteur Rev-erb ou la fixation du complexe
formé de ladite substance et du récepteur Rev-erb sur
son élément de réponse, et/ou sur un facteur nucléaire
capable de coupler fonctionnellement Rev-erb au complexe
30 ARN-polymérase, et/ou

 - la modulation de l'activité
transcriptionnelle des gènes placés sous le contrôle
d'un promoteur comprenant l'élément de réponse de Rev-
erb.

4) Procédé de criblage de substances utiles dans le traitement des dysfonctionnements du métabolisme lipidique consistant à déterminer l'effet de la substance à tester sur la modulation de l'expression du gène codant pour le récepteur Rev-erb.

5) Utilisation d'une substance sélectionnée par un procédé de criblage selon l'une des revendications 3 à 4 pour la préparation d'une composition notamment pharmaceutique utile pour le traitement des dysfonctionnements du métabolisme lipidique liés à l'apolipoprotéine C-III chez l'homme ou l'animal.

6) Utilisation d'une substance capable de se fixer au récepteur Rev-erb ou à son élément de réponse pour la préparation d'une composition pharmaceutique utile pour le traitement et/ou la prévention des dysfonctionnements du métabolisme lipidique liés à l'apolipoprotéine C-III chez l'homme ou l'animal.

7) Utilisation d'une substance capable de moduler l'activité transcriptionnelle d'un gène placé sous le contrôle d'un promoteur contenant l'élément de réponse du récepteur Rev-erb pour la préparation d'une composition pharmaceutique utile pour le traitement et/ou la prévention des dysfonctionnements du métabolisme lipidique liés à l'apolipoprotéine C-III chez l'homme ou l'animal.

8) Utilisation d'une substance capable de moduler l'expression du gène codant pour le récepteur Rev-erb pour la préparation d'une composition notamment pharmaceutique utile pour le traitement et/ou à la prévention des dysfonctionnements du métabolisme

lipidique liés à l'apolipoprotéine C-III chez l'homme ou l'animal.

Figure 1
HepG2

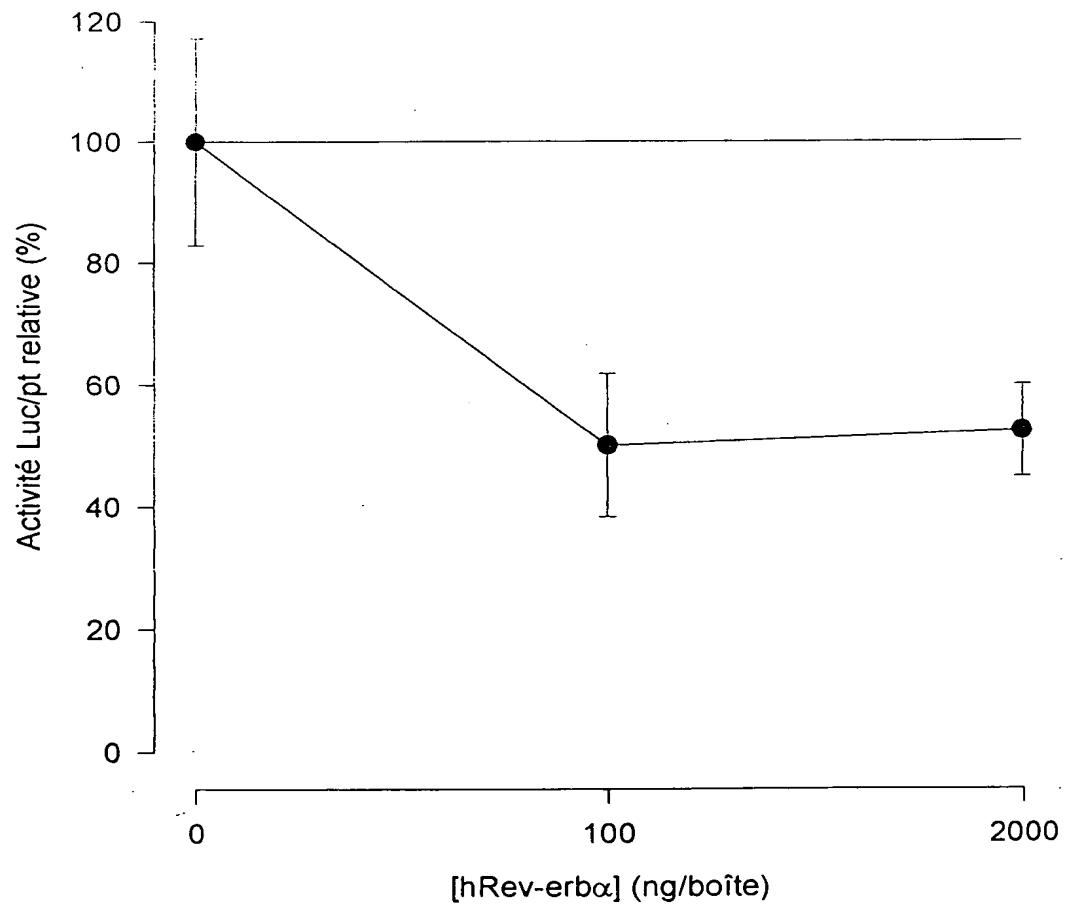


Figure 2
RK13

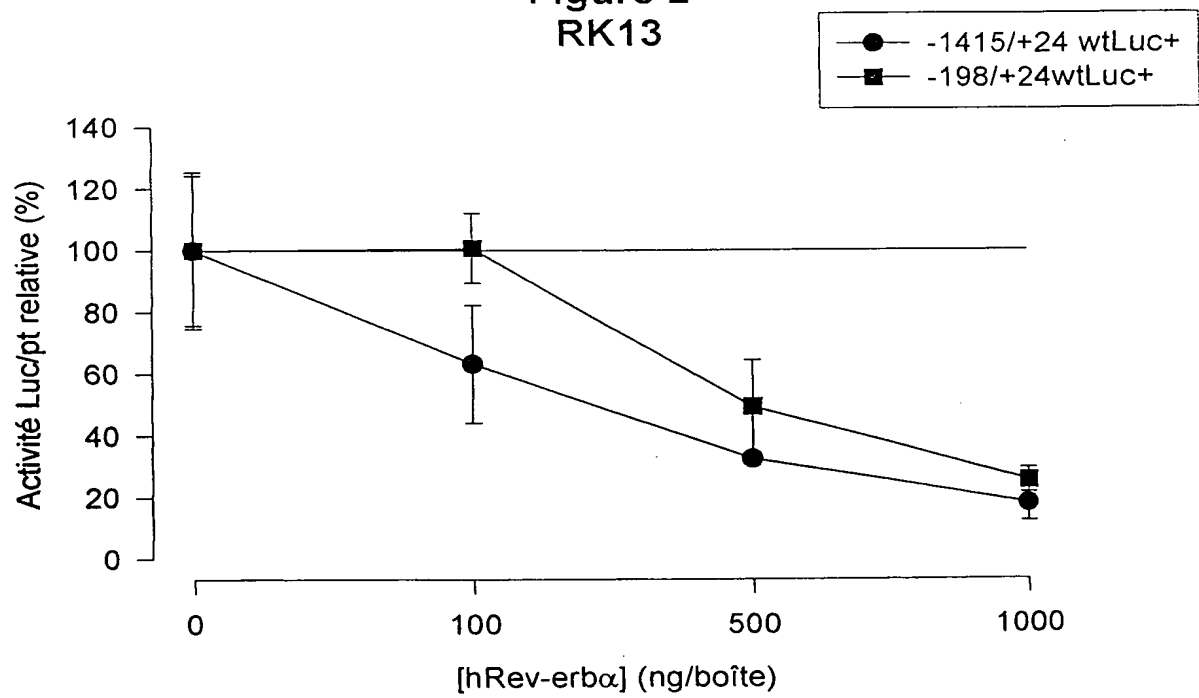


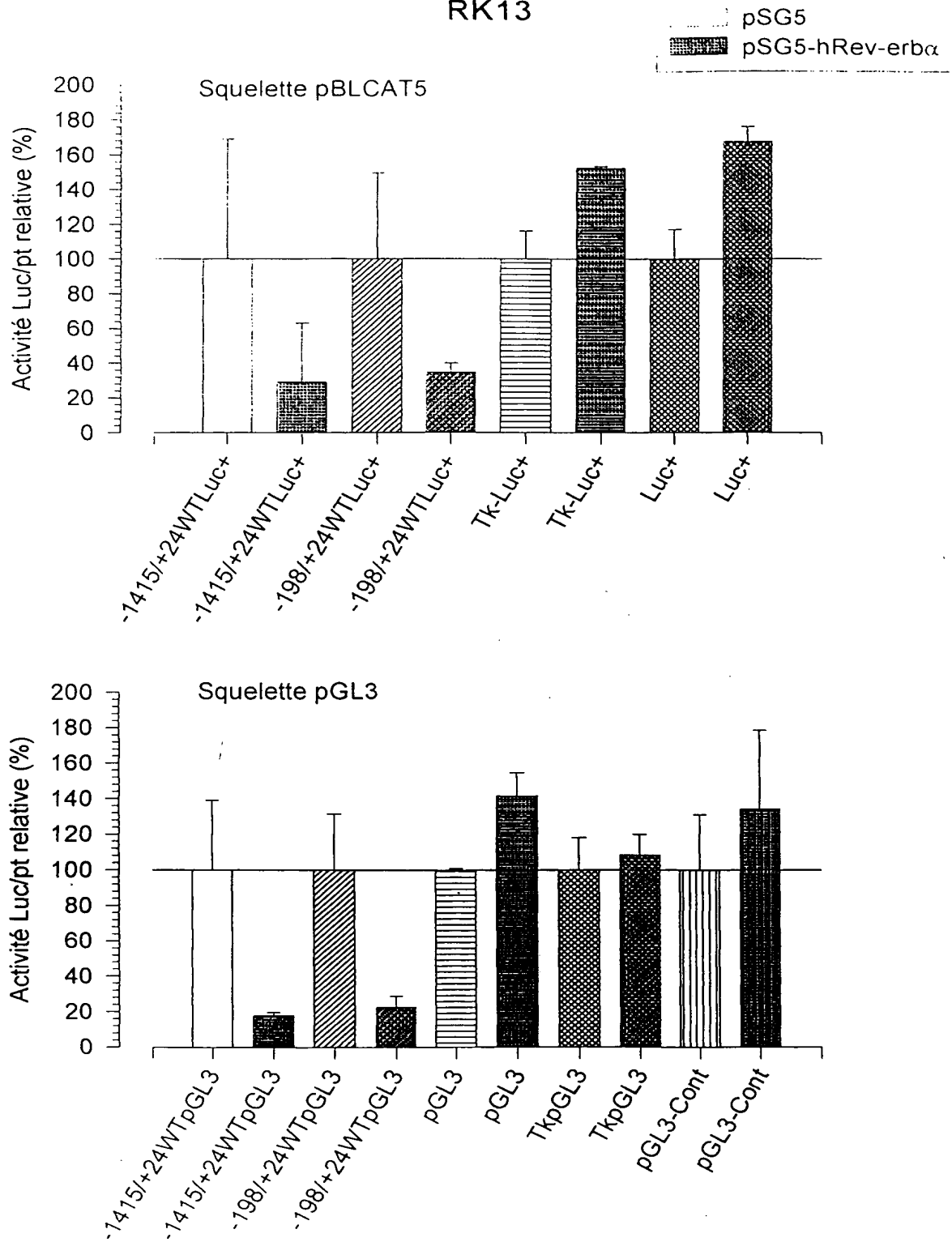
Fig.3
RK13

Figure 4
RK13

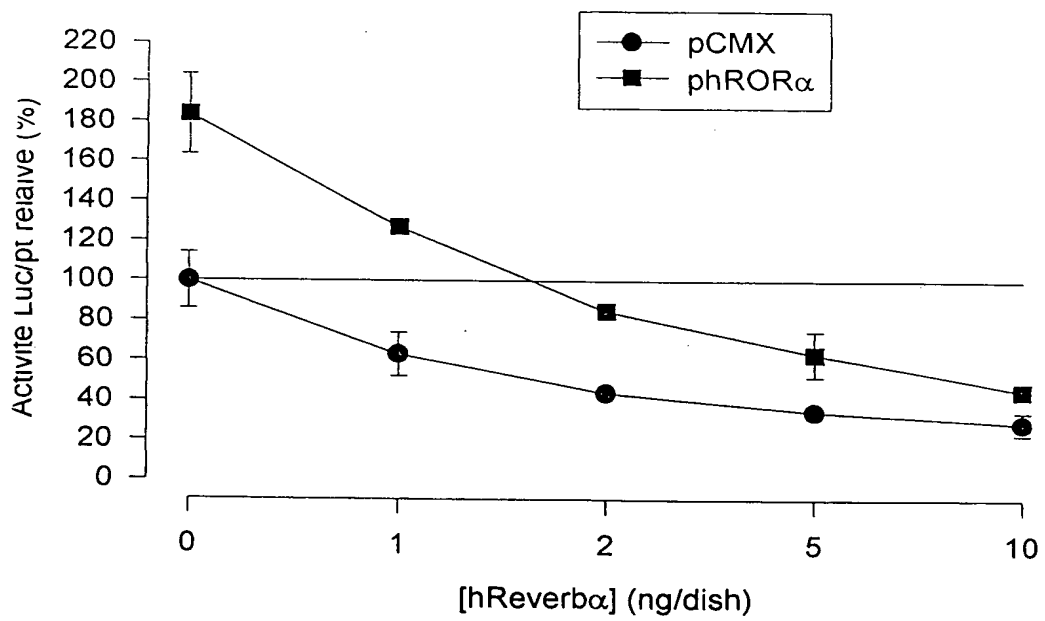


Figure 5
RK13

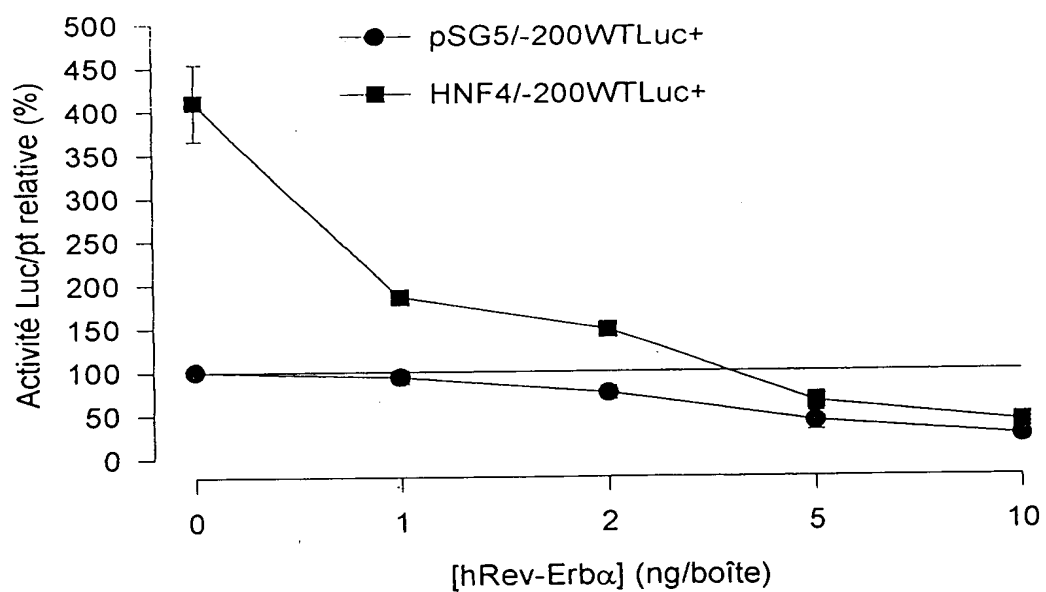


Figure 6

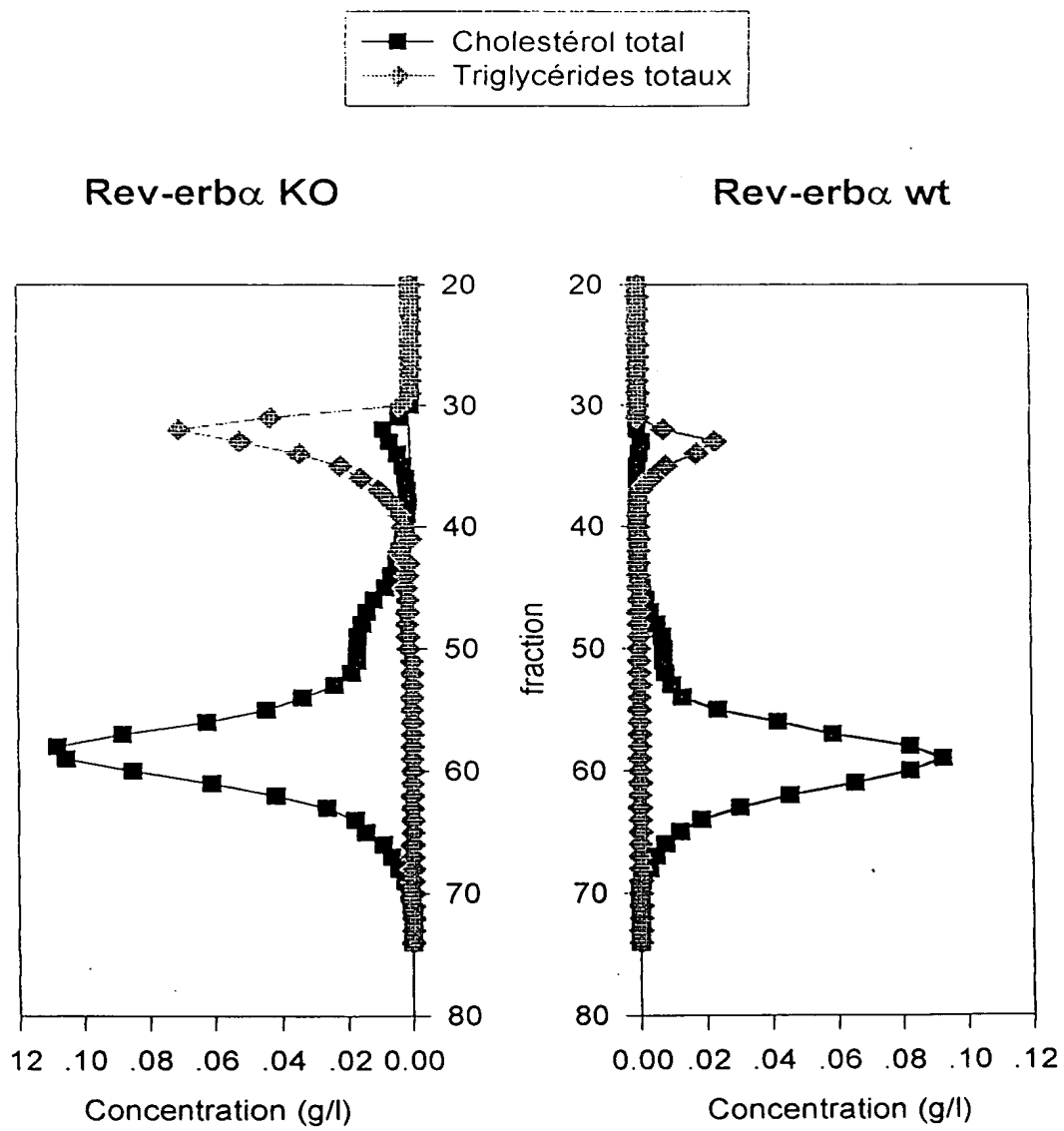


Figure 7

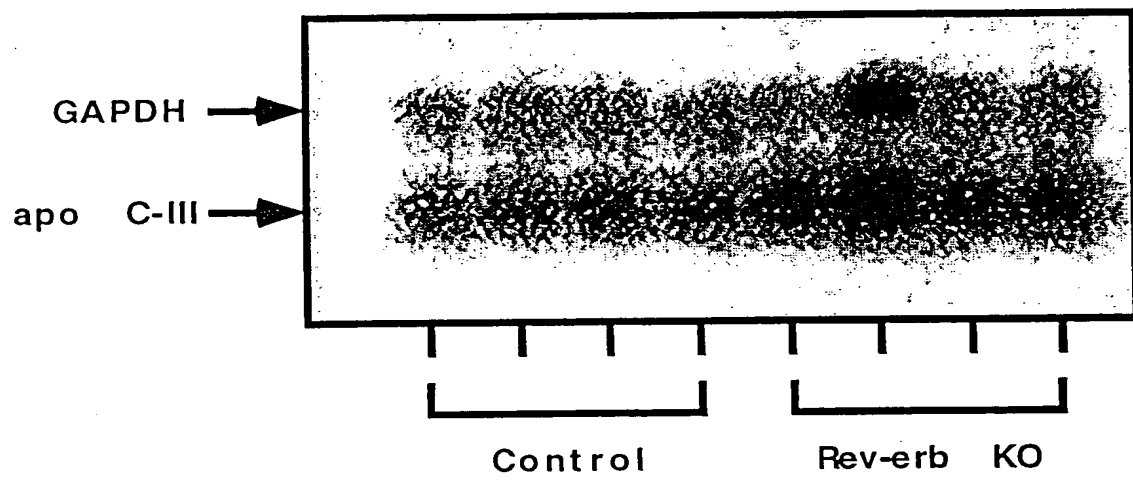


Figure 8

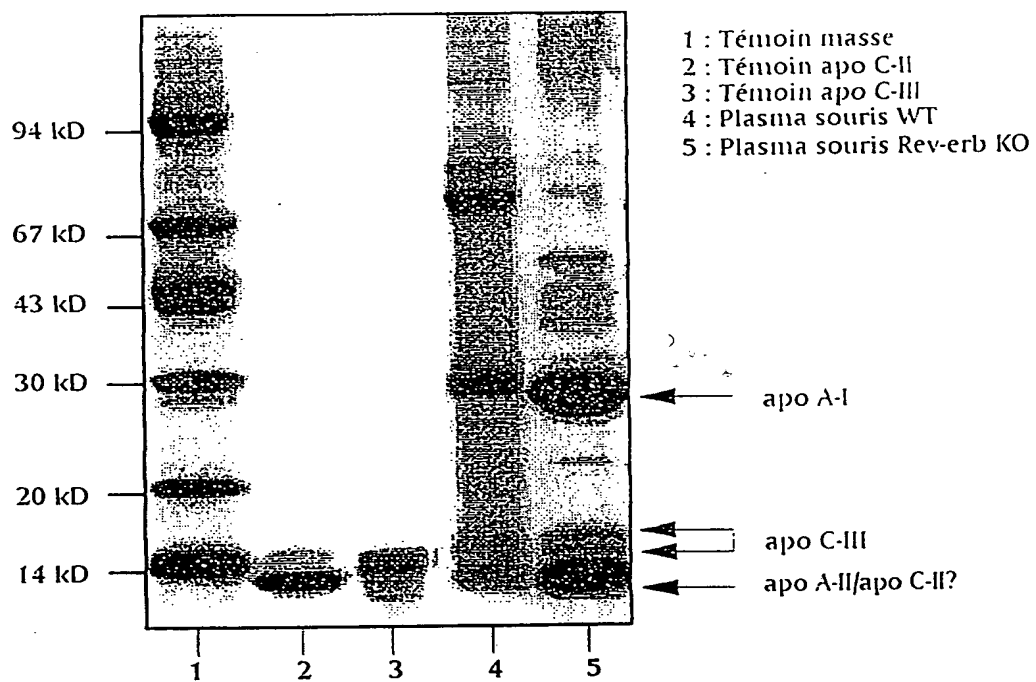


Figure 9

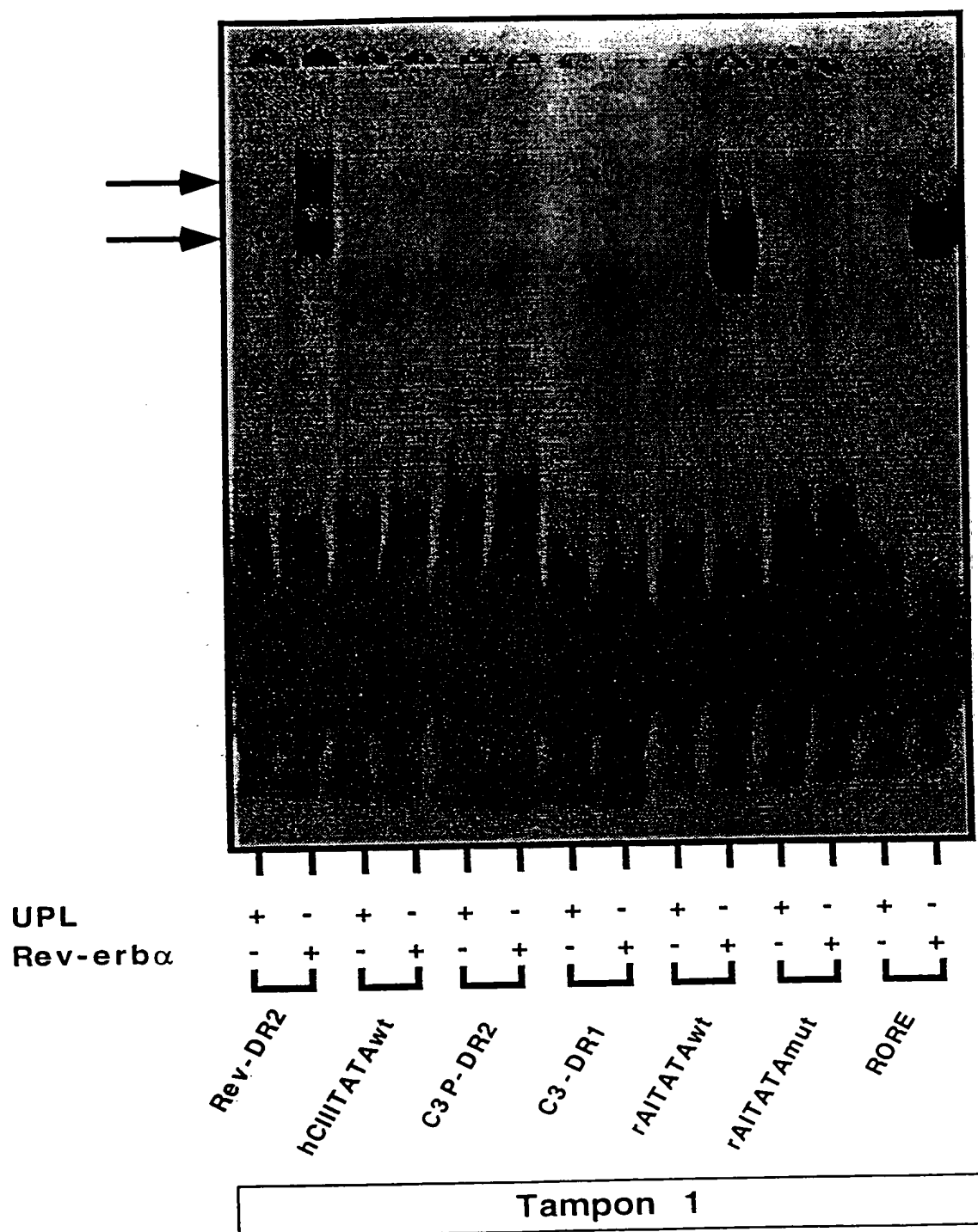


Figure 10

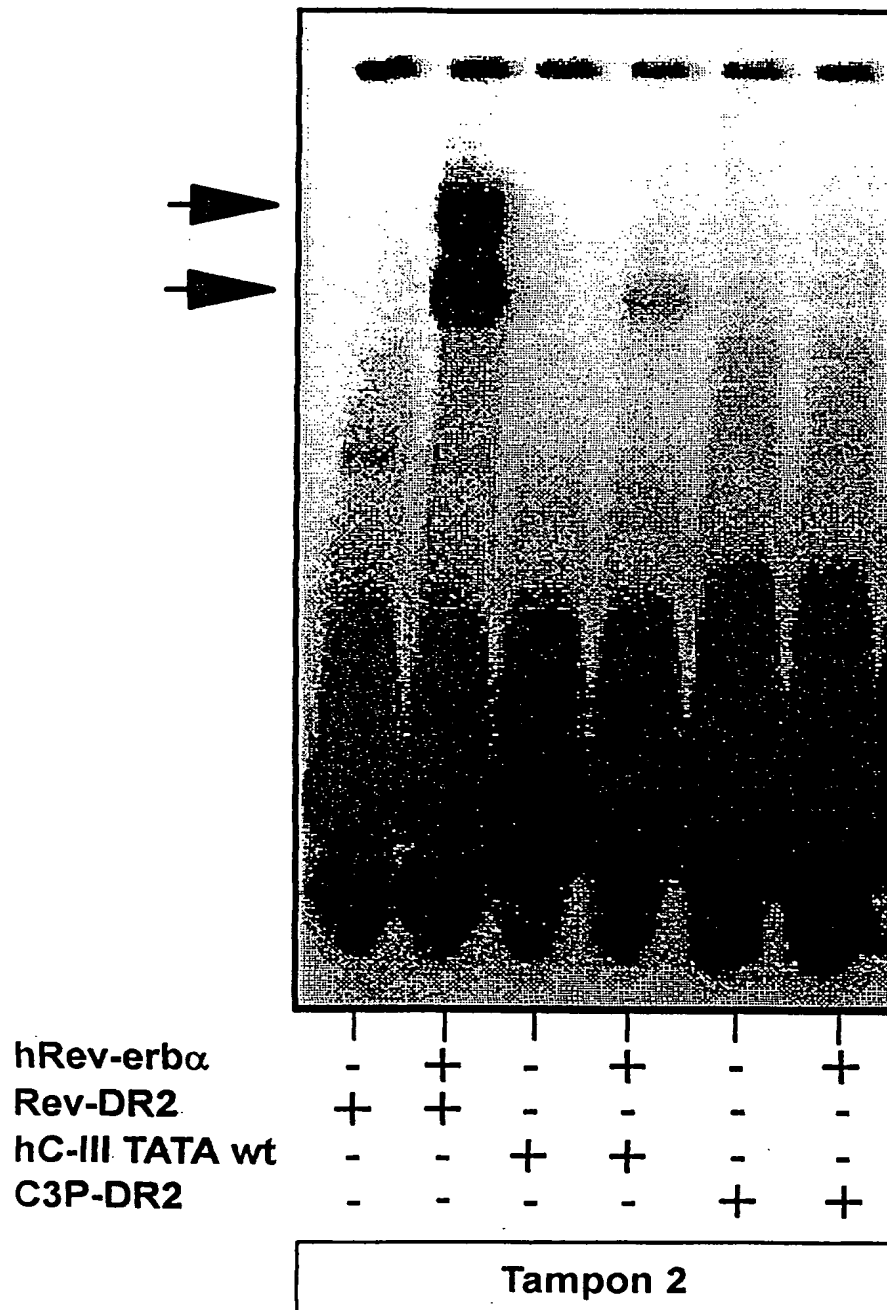


Figure 11
RK13

